

PARTIAL TRANSLATION OF JP 61-000084 A FOR IDS

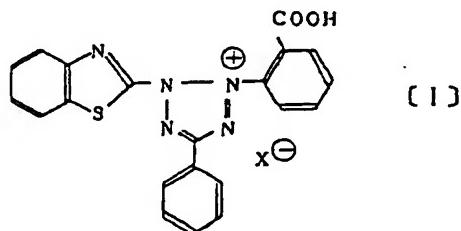
(19) Japanese Patent Office (JP)  
(12) Official Gazette (A)  
(11) Publication Number: Sho 61-84  
(43) Date of Publication: January 6, 1986  
(51) Int. Cl. C07D 417/04  
      //G01N 33/50  
      (C07D 417/04  
      257:00  
      277:00)

Request for Examination: Not yet submitted  
Number of Inventions: 2 (total 7 pages)

(54) Title of the Invention: New Tetrazolium Compound  
      (21) Application Number: Sho 59-118602  
      (22) Date of Filing: June 9, 1984  
(72) Inventor: Mikiaki TANAKA  
                 [Translation of Address Omitted]  
(72) Inventor: Hiromi NAWA  
                 [Translation of Address Omitted]  
(72) Inventor: Masami ISHIHARA  
                 [Translation of Address Omitted]  
(71) Applicant: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.  
                 [Translation of Address Omitted]

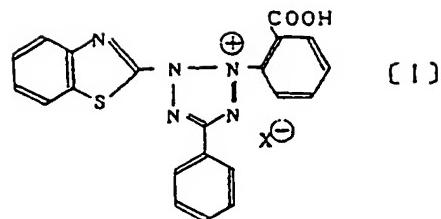
[Page 1075 bottom left col. line 5 – bottom right col. line 15]

(1) A 2-(2-benzothiazolyl)-3-(2-carboxyphenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium salt, represented by the general formula



(wherein X is halogen).

(2) A method for quantifying a biological fluid component characterized by allowing a tetrazolium compound represented by the general formula



(wherein X is halogen) to coexist with an enzyme reaction system so as to obtain formazan, which is a reductant, and measuring a coloration thereof.

(3) The method for quantifying a biological fluid component according to claim 2, wherein the enzyme reaction system is a system for generating a reducing substance.

(4) The method for quantifying a biological fluid component according to claim 3, wherein the reducing substance is reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) or reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH).

(5) The method for quantifying a biological fluid component according to claim 3, wherein the reducing substance is superoxide ion.

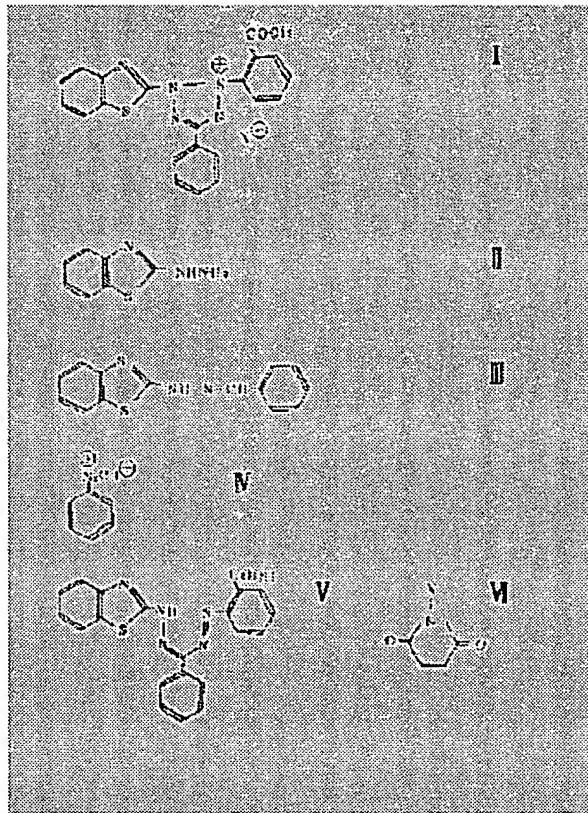
\* \* \* \* \*

## NOVEL TETRAZOLIUM COMPOUND

**Patent number:** JP61000084  
**Publication date:** 1986-01-06  
**Inventor:** TANAKA MIKI AKI; others: 02  
**Applicant:** WAKO JUNYAKU KOGYO KK  
**Classification:**  
 - International: C07D417/04  
 - european:  
**Application number:** JP19840118602 19840609  
**Priority number(s):**

## Abstract of JP61000084

**NEW MATERIAL:** A 2-(2-benzothiazolyl)-3-(2-carboxyphenyl)-5-phenyl-2H-tetrazolium salt expressed by formula I (X is halogen).  
**USE:** For quantitative determination of biological humoral components utilizing a redox reaction.  
**PREPARATION:** A heterocyclic hydrazone expressed by formula II as a starting material is reacted with benzaldehyde to give a compound expressed by formula III, which is then reacted with a compound expressed by formula IV in the presence of an alkali to afford a compound expressed by formula V. The resultant compound expressed by formula V is then reacted with a compound expressed by formula VI, etc.



Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A) 昭61-84

⑫ Int.Cl.

C 07 D 417/04  
// G 01 N 33/50  
(C 07 D 417/04  
257:00  
277:00)

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)1月6日

7431-4C  
Z-8305-2G  
7431-4C  
6664-4C  
7330-4C

審査請求 未請求 発明の数 2 (全 7 頁)

⑭ 発明の名称 新規なテトラゾリウム化合物

⑮ 特願 昭59-118602

⑯ 出願 昭59(1984)6月9日

⑰ 発明者 田中 幹晃 浦和市別所2丁目13番3号

⑰ 発明者 名和 裕美 富士見市西みずは台2丁目6番3号

⑰ 発明者 石原 正巳 川越市笠幡159-1

⑰ 出願人 和光純薬工業株式会社 大阪市東区道修町3丁目10番地

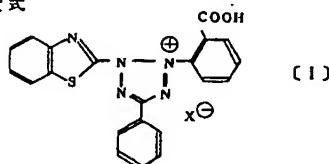
明細書

1. 発明の名称

新規なテトラゾリウム化合物

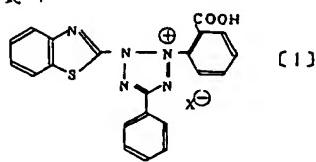
2. 特許請求の範囲

(1) 一般式



(式中、Xはハロゲンを表わす。)で示される、  
2-(2-ベンゾチアゾリル)-3-(2-カルボキシフェニル)-5-フェニル-2H-テトラ  
ゾリウム塩。

(2) 一般式



(式中、Xはハロゲンを表わす。)で示されるテ  
トラゾリウム化合物を、酵素反応系に共存させて、  
還元体であるホルマザンを得、その呈色を測定す  
ることを特徴とする生体体液成分の定量方法。

(3) 酵素反応系が還元性物質を生成する系であ  
る特許請求の範囲第2項記載の生体体液成分の定  
量方法。

(4) 還元性物質が還元型ニコチンアミドアデニ  
ンジヌクレオチド (NADH) 又は還元型ニコチ  
ンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NAD  
PH) である、特許請求の範囲第3項記載の生体  
体液成分の定量方法。

(5) 還元性物質がスーパーオキサイドイオンで  
ある、特許請求の範囲第3項記載の生体体液成分  
の定量方法。

3. 発明の詳細な説明

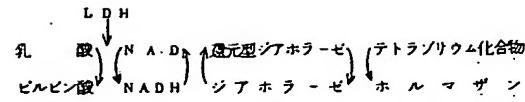
本発明は、ヘテロ環とカルボキシル基とをもつ  
新規なテトラゾリウム塩に関する。

一般に、テトラゾリウム塩は容易に還元されて  
有色のホルマザンを生成することは周知であり、

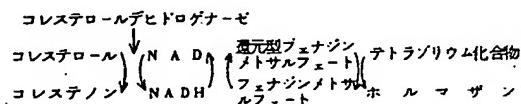
この反応を利用して還元性物質を定量する測定方法が種々知られている。

例えば、テトラゾリウム化合物は、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NADH)、又は還元型ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)の水素受容体として機能するとか、スーパー・オキサイドイオンやアスコルビン酸によって還元され、夫々の結果として定量的に生成するホルマザンの量に比例する発色の程度を、吸光度測定法で測定することによって、NADH、NADPH又はスーパー・オキサイドイオン、アスコルビン酸などの還元性物質の量を測定することができる。従って周知の通り、脱水素酵素の活性度の測定、それによる基質の定量、更にスーパー・オキサイドイオンを生成する酸化酵素の作用対象である基質の定量、即ち生体液成分とか食品中の添加物などの定量に極めて有用である。

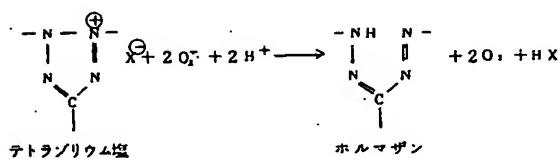
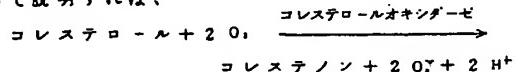
これらの原理を、乳酸脱水素酵素(LDH)の活性度の測定の場合に例をとって示せば、



であり、これらの反応は定量的且つ特異的に進行するから、生成するホルマザンの色濃度を定量することによって、LDHの活性度を測定することができる。また脱水素酵素を使用した生体液成分の測定を、コレステロールの測定について示せば、



であり、同様にコレステロールの量を測定することができる。次にスーパー・オキサイドイオンの測定によって、コレステロールを定量する場合について説明すれば、



であり同様にしてコレステロールを定量することができる。この式に於て、Xはハロゲンを示す。

かかる方法の為に、従来提供されているテトラゾリウム化合物としては、2-(4-ヨク化フェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2'H-テトラゾリウム塩(INT)、3-(4,5-ジメチルチアソリル-2)-2,5-ジフェニル-2'H-テトラゾリウム塩(NTT)、2,2',5,5'-テトラキス(4-ニトロフェニル)-3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ジフェニレン)-2H、2'H-ジテトラゾリウム塩(NO<sub>2</sub>-TB)、2,2'-ジフェニレン-3,3',5,5'-テトラフェニル-2H、2'H-ジテトラゾリウム塩(Neo-TB)などがあり、これらが還元されて生成するホルマザンの極大吸

取波長及び分子吸光係数を示すと、夫々、次の通りである。

表 1

ホルマザン テトラゾリウム塩	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	$\epsilon / 10^4$
INT	490	1.5
NTT	565	2.0
NO <sub>2</sub> -TB	530	3.6
Neo-TB	505	1.4

これらのホルマザンは、 $\lambda_{\text{max}} = 490 \sim 565$  nm IC、 $\epsilon = 1.4 \times 10^4 \sim 3.6 \times 10^4$  の吸収を示し、これを利用して生体試料中の体液成分を定量することができる。

しかしながら、生体試料中には、500 nm 近辺に吸収をもつビリビンやヘモグロビンが存在し、これらの着色物質の存在が、上記ホルマザンの極大吸収波長近傍の吸収スペクトルに少なからぬ影響を及ぼし、測定値に誤差を与えている。こ

のような着色物質の影響は、その測定波長が  $\lambda_{max} = 600\text{ nm}$  以上であるときは、効果的に回避される。

そこで、これら着色物質の影響を回避する目的で、ホルマザンのキレート化合物を測定に利用する試みがなされている。

一般に、ホルマザンは、 $\text{Co}^{2+}$  や  $\text{Ni}^{2+}$ などの金属イオンとキレート化合物を生成し、その極大吸収波長は、より長波長側へシフトする。例えば、前記 MTT の  $\text{Co}$  キレートは、 $\lambda_{max} = 660\text{ nm}$  ( $\epsilon = 2 \times 10^4$ ) となることが知られている。

しかしながら、コバルトイオンはそれ自体酸化や還元を受け易いので、臨床化学分析に於て、測定誤差の原因となり得る。

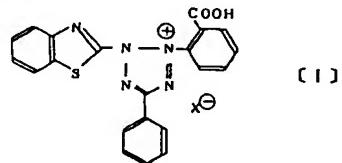
一方、 $\text{Ni}^{2+}$  キレート化合物は、酵素分析に於て重要な中性付近の pH に於て比較的安定性が期待されるものであり、且つ取扱いが容易なため、更にまた、ニッケルイオンはコバルトイオンのように酸化や還元を受け易くないので、臨床化学分析に於ける測定に有用であると考えられるが、一

般に  $\text{Ni}$  キレートは、ホルマザン化合物とのキレート生成反応が遅いことで知られており (JAPAN ANALYST, Vol. 16 (1967), 「ホルマザン化合物の合成と金属イオンとの反応」, 1367 頁)、この問題点を解決した、 $\text{Ni}^{2+}$  とのキレートを容易に生成させるホルマザンをもたらす、新規なテトラゾリウム塩の開発が要望されていた。

本発明者らは、これらの欠点を解決すべく総意研究の結果、その還元成績体であるホルマザンと  $\text{Ni}^{2+}$  とのキレート生成反応が速やかで、且つ生成したキレートの極大吸収波長が  $600\text{ nm}$  以上である、新規なテトラゾリウム塩を見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、

一般式



(式中、Xはハロゲンを表わす。)で示される。  
2-(2-ベンゾチアゾリル)-3-(2-カルボキシフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム塩(以下、BTCP-Tと略称する。)、及びこれを用いる生体々液成分の定量方法の発明である。

本発明化合物 [1] に於けるハロゲンとしては、塩素、臭素、ヨウ素等が挙げられる。

BTCP-T は、中性付近の pH で、NADH や NADPH、スーパー・オキサイドイオン、アスコルビン酸などの還元性物質によって、要すればジアホラーゼやフェナジンメトサルフェート(PMS)などの電子伝達体の存在下に、容易に還元される。

このような還元反応により生成した、BTCP-T の還元成績体であるホルマザン(以下、BTCP-Pと略称する。)は、中性付近の緩衝溶液中、速やかに、 $\text{Ni}^{2+}$  と反応して、極大吸収波長  $600\text{ nm}$  以上に強い吸収を有するキレート化合物を生成する。

次に、NADH の定量の場合を例にとって、本

発明を更に詳細に説明する。

実験例 NADH の定量

2-(2-ベンゾチアゾリル)-3-(2-カルボキシフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウムクロリド(BTCP-T-C1)を  $0.5\text{ mmol/L}$  1-メトキシフェナジンメトサルフェート(以下、1-メトキシ-PMSと略称する。)を  $1.2\text{ pmol/L}$ 、NADH を  $50\text{ pmol/L}$  の濃度になるように溶解した  $50\text{ mM}$  トリス塩酸緩衝液( $\text{pH} = 8.5$ )を調製し、この溶液のUV 吸収を測定する。結果を表2に示す。

また、これに、トリトン X-100 を  $0.2\%$  の濃度になるように添加した場合、及びトリトン X-100 を  $0.2\%$  及び  $\text{NiCl}_2$  を  $1\text{ mmol/L}$  の濃度になるように添加した場合の極大吸収波長及び分子吸光係数も併せて表2に示す。

以下余白



表 2

No.	測定系	$\lambda_{\text{max}}(\text{nm})$	$\epsilon / 10^4$
1	B T C P F	500	2.33
2	B T C P F 0.2%トリトンX-100	515	2.63
3	B T C P F 0.2%トリトンX-100 NiCl <sub>2</sub> 1mmol/L	605	1.21

No. 3 の Ni<sup>2+</sup> キレート生成反応は速やかに進行し、反応開始後 5 分間で既に安定した呈色が得られるが、より完全に安定化した呈色を得たい場合でも、反応開始後、約 10 分間置けば充分である。

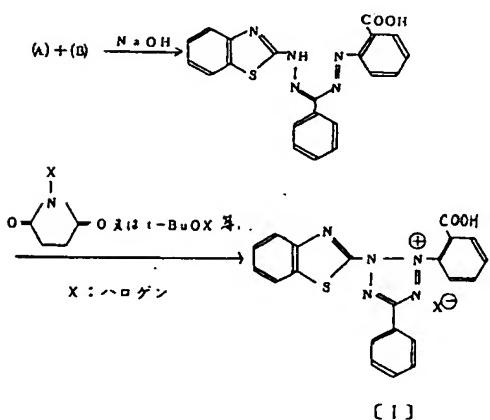
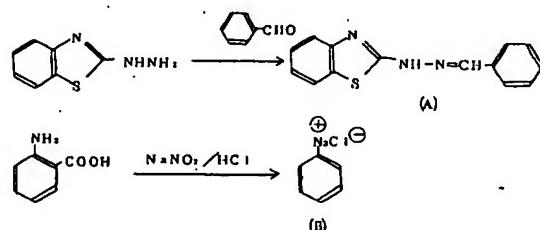
このように本発明の新規なテトラゾリウム塩は、その還元成績体であるホルマザンと Ni<sup>2+</sup>とのキレート生成反応が速やかで、且つ生成したキレートの極大吸収波長が 600 nm 以上と長波長側にあり、また、その分子吸光係数も  $1.21 \times 10^4$  と

## 特開昭61-84(4)

体液成分の測定に充分な強さを有しているので、レドックス反応を利用する臨床化学分析に於て、有効に使用し得る。

本発明の新規なテトラゾリウム塩をレドックス反応を利用した生体体液成分の定量に使用する場合の方法及び操作に関しては還元成績体であるホルマザンを Ni<sup>2+</sup> キレートとする以外は、既存のテトラゾリウム塩を用いた既知の定量方法及び測定操作に従って行なえばよい。

本発明の新規テトラゾリウム塩の合成は、通常以下の反応式に従って行なわれる。



即ち、一般に、ヘテロ環状アミンはジアゾ化が困難で、且つジアゾニウム塩は不安定であるから、ヘテロ環状ヒドラジンからの合成が好ましく、この方法に従って行なった場合、2-ヒドラジノベンゾチアゾールからの通算收率 20~30% で、目的のテトラゾリウム塩 [I] が得られる。各工程の合成法は、自体公知のそのような合成方法に従うこととで足りる。

本発明は、従来、ホルマザンとのキレート生成反応が遅いとされていた、 Ni<sup>2+</sup> とのキレート生成反応が速やかで、且つ、酵素分析に於て重要な中性付近に於ても充分安定なキレート化合物を与える、生体試料中の体液成分の測定の際、測定妨害物質となるビリルビンやヘモグロビンの影響を回避することができる 600 nm 以上の波長に於て、それら体液成分の測定に充分な強さの極大吸収を与えるホルマザンを生成する新規なテトラゾリウム塩を提供するものであり、斯くて貢献するところ極めて大なるものがある。

以下に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものでない。実施例 1. 2-(2-ベンゾチアゾリル)-3-(2-カルボキシフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム クロリド [B T C P T - C1] の合成

(1) ベンズアルデヒド-2-ベンゾチアゾリルヒドラジンの合成

2-ヒドラジノベンゾチアゾール 8.3 g (

0.05 mol)、ベンズアルデヒド 5.3 g (0.05 mol)、メタノール 100 ml を混合し、2時間還流反応させる。20℃に冷却後、沪取して、淡黄色結晶 1.25 g を得る。収率 9.8.7%。

mp. 221~223℃ (lit. 221~222℃)。

IR (KBr) : 1623 cm<sup>-1</sup> (-N=CH-),  
(2) 1-(2-ベンゾチアゾリル)-3-フェニル-5-(2-カルボキシフェニル)ホルマザン [BTCPF] の合成

アントラニル酸 6.2 g (0.045 mol)、塩酸 13.7 g (0.135 mol) を蒸留水 80 ml に溶解し、氷冷下、NaNO<sub>2</sub> 3.1 g (0.045 mol) と蒸留水 20 ml の溶液を、3~10℃で、約5分間かけて滴下し、後、10℃で20分間反応させ、ジアゾニウム塩の溶液を得る。

次に、先の反応で得られたベンズアルデヒド-2-ベンゾチアゾリルヒドラゾン 7.6 g (0.03 mol) をテトラヒドロフラン 300 ml に溶解し、これに 9.5% NaOH 水溶液 6.0 g (0.143

mol) を添加した混合液に、先のジアゾニウム塩の溶液を、氷冷下、3~5℃で約1時間かけて滴下し、同温度で3時間反応後、反応液を蒸留水 1200 ml 中に注ぎ、析出した副生成物を沪去し、沪液を酢酸 15 ml で中和して、分離した黒色油分を分ける。これをジオキサン 100 ml に溶解し、蒸留水 400 ml を加え、析出晶を沪取、乾燥して、紫色晶 1.07 g を得る。この全量をエタノール 500 ml と蒸留水 500 ml の混合液に加え、1時間還流することにより洗浄し、そのまま 10℃以下に冷却し、沪取、乾燥して、紫色晶 5.9 g を得る。収率 48.7%。

mp. 191~192℃ (分解)。

IR (KBr) : 1664 cm<sup>-1</sup> (>C=O)。

(3) 2-(2-ベンゾチアゾリル)-3-(2-カルボキシフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム クロリド [BTCP-T-CI] の合成

先の反応で得られた BTCPF 1.5 g (3.7 mmol) をクロロホルム 150 ml に溶解し、水

冷下、5℃以下で、酢酸 1 ml を注入し、これに: -BuOCl 1.2 g (1.1 mmol) を、3~5℃で注入し、同温度で2時間反応させる。析出した結晶を沪取、洗净、乾燥して、黄色晶 0.8 g を得る。収率 49.6%。

mp. 140~141℃ (分解)。

IR (KBr) : 1700 cm<sup>-1</sup> (>C=O)。

#### [元素分析値]

計算値: C 57.87; H 3.24; N 16.07

実測値: C 57.63; H 3.27; N 15.93

#### 実施例2. NADHの定量

BTCP-T-CI を 0.5 mmol/L、1-メトキシ-PMS を 1.2 μmol/L、トリトンX-100 を 0.2% の濃度になるように、これらを 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH = 8.5) に溶解し、発色試薬とする。

NADH を各々 20, 40, 60, 80, 100 μmol/L の濃度になるように、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH = 8.5) に溶解し、標準液とす

酸緩衝液 (pH = 8.5) に溶解し、標準液とする。標準液 1.5 ml をとり、発色試液 1.5 ml を加えて、37℃恒温槽中 10 分間加温後、試薬盲検を対照として波長 515 nm における吸光度を測定する。この際の測定液中の NADH の濃度は、各々 10, 20, 30, 40, 50 μmol/L である。

各 NADH 濃度 (μmol/L) に対してプロットした吸光度 (OD) を結ぶ検量線は、第1図に示されるように、原点を通る直線となり、検量線は良好な定量性を示している。

#### 実施例3. NADH の定量

BTCP-T-CI を 0.5 mmol/L、1-メトキシ-PMS を 1.2 μmol/L、トリトンX-100 を 0.2%、NiCl<sub>2</sub> を 1 mmol/L の濃度になるように、これらを 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH = 8.5) に溶解し、発色試薬とする。

NADH を各々 20, 40, 60, 80, 100 μmol/L の濃度になるように、50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH = 8.5) に溶解し、標準液とす

る。

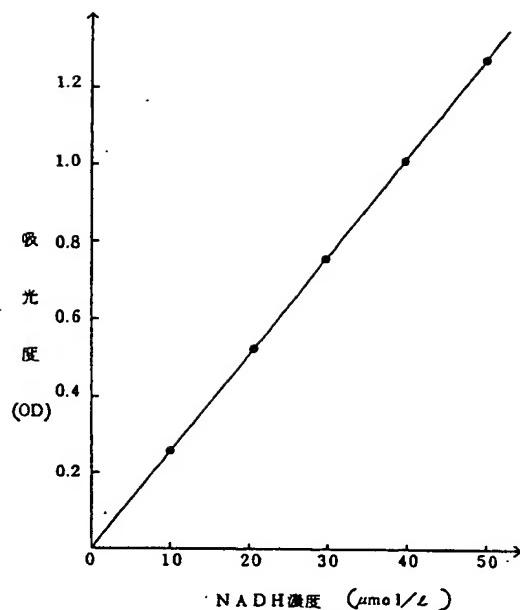
標準液 1.5 ml をとり、発色試液 1.5 ml を加えて、37℃恒温槽中 10 分間加温後、試薬盲検を対照として波長 605 nm における吸光度を測定する。この際の測定液中の NADH の濃度は、各々 10, 20, 30, 40, 50 μmol/l である。

各 NADH 濃度 ( $\mu\text{mol/l}$ ) に対してプロットした吸光度 (OD) を結ぶ検量線は、第 2 図に示されるように、原点を通る直線となり、検量線は良好な定量性を示している。

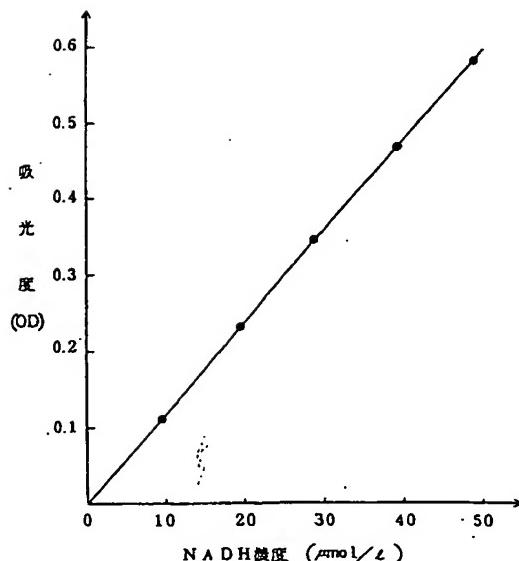
#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図及び第 2 図は、各々、実施例 2 及び実施例 3 に於て得られた検量線を表わし、横軸の各 NADH 濃度 ( $\mu\text{mol/l}$ ) について得られた吸光度を縦軸に沿ってプロットした点を結んだものである。

特許出願人 和光純業工業株式会社



第 2 図



#### 手 続 换 正 書

昭和 60 年 8 月 29 日

特許庁長官 謹

##### 1. 事件の表示

昭和 59 年特許願第 118602 号

##### 2. 発明の名称

新規なテトラゾリウム化合物

##### 3. 税正をする者

事件との関係 特許出願人

郵便番号 541

住所 大阪府大阪市東区道頓堀 3 丁目 10 番地  
電話番号 TEL 03-270-6571

名 称 フコジンハイドロキノン

和光純業工業株式会社

代表者 一力一生

4. 税正命令の日付  
特許庁  
60. 8. 30

特開昭61- 84 (7)

(Neo-TB)」を「3,3'-(4,4'-ビフェニレン)-ビス  
(2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム塩)(Neo-  
TB)」と補正する。

(4) 明細書15頁20行目に記載の「95%NaOH水溶  
液」を「NaOH(含量95%)」と補正する。

以 上

## 5. 補正の対象

明細書の発明の詳細な説明の欄。

## 6. 補正の内容

(1) 明細書5頁9行目から同頁11行目にかけて  
記載の「2-(4-ヨウ化フェニル)-3-(4-ニト  
ロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム  
塩(NT)」を「3-(p-ヨウ化フェニル)  
-2-(p-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H  
-テトラゾリウム塩(NT)」と補正する。

(2) 明細書5頁14行目から同頁17行目にかけて  
記載の「2,2',5,5'-テトラキス(4-ニトロフェニ  
ル)-3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ジフェニレ  
ン)-2H,2'H-ジテトラゾリウム塩(XO<sub>2</sub>-TB)」を  
「3,3'-(3,3'-ジメトキシ-4,4'-ビフェニレン)  
-ビス[2-(p-ニトロフェニル)-5-フェニ  
ル-2H-テトラゾリウム塩](XO<sub>2</sub>-TB)」と補正す  
る。

(3) 明細書5頁17行目から同頁19行目にかけて  
記載の「2,2'-(p-ジフェニレン)-3,3',5,5'-  
テトラフェニル-2H,2'H-ジテトラゾリウム塩